

УДК: 615.32:579.61:571.27

ПІДБІР КОМБІНАЦІЇ ПРОБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР ДЛЯ СТВОРЕННЯ РЕКТАЛЬНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ*Тішена Л.О., Калюжная О.С., Хохленкова Н.В.*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Сучасні умови життєдіяльності людини характеризуються постійним впливом несприятливих біо-, техно-, соціогенних чинників, інтенсивність впливу яких часто перевищує компенсаторні можливості мікроекологічної системи макроорганізму. Порушення мікробіоценозу грають істотну роль в патогенезі великої кількості захворювань різної етіології, що дозволяє розглядати проблему корекції дисбіозів як загальномедичну. Цим обумовлена необхідність створення ефективних і доступних пробіотичних препаратів у різних лікарських формах, призначених для підтримки і відновлення симбіотичних мікробіоценозів людини [1, 2].

Враховуючи те, що нормофлора шлунково-кишкового тракту бере участь у процесах травлення в людському організмі, його захисті від захворювань, а також формуванні імунної системи і підтримці її гомеостазу [3, 4], то проблема створення комплексного препарату для відновлення мікрофлори шлунково-кишкового тракту та одночасного запобігання або лікування інфекцій є важливою та актуальною. Розробка та впровадження у виробництво такого препарату дозволить підвищити ефективність профілактики та лікування інфекційних захворювань і розширити асортимент вітчизняних препаратів.

Мето дослідження. Провести мікробіологічні дослідження з підбору оптимального співвідношення пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій для подальшого створення ректальної лікарської форми із комбінацією пробіотиків.

Методи дослідження. Для розробки складу ректальних супозиторіїв для профілактики та лікування дисбіотичних станів в якості діючих компонентів використовували пробіотичні культури, що складають основу препаратів «Лактобактерин сухий» та «Біфідумбактерин сухий». Лактобактерин сухий – мікробна маса живих, антагоністично активних штамів *L. fermentum* 90Т-С4, або *L. fermentum* 39, або *L. plantarum* 8Р-А3, або *L. plantarum* 38, ліофілізована у середовищі культивування із додаванням одного із захисних середовищ: цукрозо-желатозного, молочно-цукрозо-желатозного, збираного молока. Біфідумбактерин сухий – мікробна маса живих, антагоністично активних штамів *B. bifidum* №1 або 791 або ЛВА-3, ліофілізована у середовищі культивування із доданням цукрово-желатино-молочного середовища.

Для визначення приналежності мікроорганізмів, що входять до складу препарату, до видів *L. fermentum* або *L. plantarum* та *B. bifidum* використовували диференціально-діагностичний метод забарвлення за Грамом. Дослідження бактерій у забарвленому препараті дозволяє вивчити морфологію клітини та отримати уявлення про деякі деталі їх будови. За методом Грама визначається здатність бактерій утримувати барвник (грампозитивні бактерії) або знебарвлюватись у спирті (грамнегативні бактерії), що пов'язане з відмінностями у хімічному складі та структурі клітинних стінок.

Для визначення антагоністичної активності пробіотичних мікроорганізмів використовували метод перпендикулярних штрихів за модифікованою методикою А.А. Ленцнера. В якості тест-культур використовували штами бактерій *Escherichia coli* УКМ В-906 (АТСС 25922 (F-50)), *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (АТСС 25923 (F-49)), *Bacillus subtilis* УКМ В-901 (АТСС 6633), *Proteus vulgaris* УКМ В-905 (АТСС 6896), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-907 (АТСС 27853 (F-51)) та грибів *Candida albicans* УКМ Y-1918 (АТСС 885-653), які попередньо вирощували протягом 24 год при температурі (37±1) °С (бактерії) та 48 год при температурі (25±1) °С (гриби).

Пробіотичні культури вирощували у рідкому живильному середовищі м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) протягом 48 год при температурі (37±1) °С, попередньо розводячи пробіотичні препарати розчином натрію хлориду ізотонічним із розрахунку 5 мл розчину на 1 дозу препарату. Мікробну суспензію пробіотичних та тест-штамів готували відповідно до стандарту каламутності на 5 ОД, розводячи розчином натрію хлориду ізотонічним. Для контролю посівної дози готували десятикратні розведення 10⁸ КУО/мл фізіологічним розчином і висівали із 5-го розведення (10³ КУО/мл) суспензії по 0,1 мл на 3 чашки густого живильного середовища (на MRS (середовище, розроблене Mann, Rogosa, Sharp) – молочнокислі бактерії, на середовище Сабуро – гриби, на МПА – бактерії). Через (24-48) год культивування при температурі (37±1) °С – для бактерій (біфідобактерії - в ексикаторі) та (24±1) °С – для грибів підраховували кількість колоній, що виростили на чашках, знаходили середнє арифметичне, помножували його на 10⁵ і таким чином отримували реальну концентрацію зависі.

Із цією метою отриману дводобову культуру лакто- та біфідобактерій висівали штрихом бактеріологічною петлею по діаметру чашок Петрі із густим середовищем MRS. Після інкубації протягом 4 діб при температурі (37±1) °С на поверхню середовища підсівали тест-культури, попередньо вирощені протягом 6 год на МПБ. Висівання виконували петлею штрихом у напрямку від зони росту досліджуваної культури, не торкаючись до неї та перпендикулярно їй.

Урахування результатів проводили за добою інкубування при температурі (37±1) °С за величиною зони відсутності росту тест-культури. Контролем росту тест-культур є їхнє паралельне висівання на чашки без висівання моно- або змішаної пробіотичної культури.

Основні результати. Підбір оптимального співвідношення культур лакто- та біфідобактерій у складі препарату проводили за результатами вивчення антагоністичних властивостей, як основного критерію відбору пробіотичних штамів. Антагоністичну активність штамів лакто- та біфідобактерій та їх змішаної культури у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1 вивчали методом перпендикулярних штрихів. Контроль числа життєздатних клітин (КУО/мл) проводили методом серійних розведень із послідовним висіванням на густе живильне середовище. Результати досліджень наведено у табл. 1.

Таблиця 1 - Антагоністична активність лакто- та біфідобактерій у різних співвідношеннях визначена методом перпендикулярних штрихів

Співвідношення лакто- та біфідобактерій	Зона затримки росту тест-культур, (M±m) мм					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1:1	23,0±0,8	27,6±0,6	22,4±0,9	18,4±0,9	22,2±0,5	40,8±0,5
1:2	21,4±0,9	25,6±0,6	21,0±0,8	14,2±0,5	20,6±0,6	39,8±0,9
1:4	19,6±0,6	24,8±0,5	18,4±0,6	13,0±0,8	18,8±0,5	35,8±0,5
2:1	22,4±0,6	26,4±0,9	21,8±0,5	18,2±0,9	20,8±0,5	40,2±0,5
4:1	22,8±0,9	28,6±0,9	23,4±0,6	20,6±0,9	22,2±0,5	41,8±0,5
Контроль						
Лактобактерії	21,8±0,5	25,6±0,6	17,8±0,5	16,4±0,9	20,8±0,5	36,4±0,6
Біфідобактерії	9,2±1,5	11,8±0,5	9,0±0,8	8,8±0,5	10,8±0,5	-

Примітки: $p < 0,05$; $n = 5$; (M±m) – довірчий інтервал; «-» – відсутність зон затримки росту тест-культур, або зона затримки росту менше 0,5 мм.

Згідно із даними табл. 1 лактобактерії у монокультурі виявляють більш виражений антагонізм ніж біфідобактерії. При цьому, у змішаній культурі зони затримки росту збільшились у порівнянні з контрольними монокультурами. При співвідношеннях 1:2, 1:4, 2:1 спостерігається тенденція до зменшення зон затримки росту референс-штамів у порівнянні зі співвідношенням 1:1. Співвідношення 4:1 є менш раціональним у порівнянні зі співвідношенням 1:1 із точки зору використання у лікарській формі. Таким чином, змішана культура лакто- та біфідобактерій у співвідношенні 1:1 є найбільш оптимальною для наших цілей - для введення до складу пробіотичного препарату, що розробляється.

Висновки. За результатами мікробіологічних досліджень обґрунтовано вміст діючих компонентів мікробної біомаси у співвідношенні лакто- та біфідобактерій 1:1 загальною кількістю клітин не менше $2 \cdot 10^7$ КУО на одну дозу/

Список літератури

1. Probiotic mechanisms of action / Miriam BB, Julio PD, Sergio MQ, et al. // Annals of Nutrition and Metabolism, 2012. – V.61, 2012. – P. 160 - 174.
2. Health benefits of probiotics / Endeshaw Abatenh, Birhanu Gizaw, Zerihun Tsegay, Genene Tefera, Endegen Aynalem // J Bacteriol Infec Dis, 2018. - Volume 2 Issue 1, 2018. - P. 17 – 27.
3. Розробка методів контролю якості та дослідження пробіотичного препарату, призначеного для лікування і профілактики алергії та дисбактеріозу / К.Г. Жемерова, О.В. Дунай, О.Ю. Галкін, Л. Малдер, С.ван Хемерт // Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2012. - Т.7, № 4, 2012. - С. 169 – 174.
4. Технологія пробіотиків / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог // Підручник. - К.: НУХТ, 2012. - 318 с.